



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>G01N 33/543, 33/547, C12N 11/06, C07C 235/20, C07D 495/04, C07C 233/40, C07F 1/00, 15/04</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/57564</b> (43) Date de publication internationale: 11 novembre 1999 (11.11.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01086 (22) Date de dépôt international: 7 mai 1999 (07.05.99) (30) Données relatives à la priorité: 98401114.8 7 mai 1998 (07.05.98) EP 98/06539 25 mai 1998 (25.05.98) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMIS-SARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BALAVOINE, Fabrice [FR/FR]; 122, rue de Javel, F-75015 Paris (FR). MIOSKOWSKI, Charles [FR/FR]; 14, rue Baudelaire, F-67200 Strasbourg (FR). SCHULTZ, Patrick [FR/FR]; 15, rue de l'Amiral Exelmans, F-67640 Fegersheim (FR). RICHARD, Cyrille [FR/FR]; 27, avenue du Plessis, F-92290 Chatenay-Malabry (FR). (74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(54) Title: METHOD FOR IMMOBILISING AND/OR CRYSTALLISING BIOLOGICAL MACROMOLECULES ON CARBON NANOTUBES AND USES (54) Titre: PROCEDE DE FIXATION ET/OU DE CRISTALLISATION DE MACROMOLECULES BIOLOGIQUES SUR DES NANOTUBES DE CARBONE ET SES APPLICATIONS (57) Abstract The invention concerns a method for immobilising and/or crystallising macromolecules, chemical reagents used in said method, resulting products and uses of said products in the field of materials and structural biology, in particular as biosensors or as biomaterials. Said method essentially consists in incubating, without stirring, for at least 15 minutes, a biological macromolecule in solution with carbon nanotubes closed at their ends, in suitable temperature and pH conditions. (57) Abrégé Procédé de fixation et/ou de cristallisation de macromolécules, réactifs chimiques mis en oeuvre dans ledit procédé, produits obtenus ainsi qu'applications desdits produits dans le domaine des matériaux et de la biologie structurale, notamment comme biocapteurs ou comme biomatériaux. Ledit procédé comprend essentiellement l'incubation, sans agitation, pendant au moins 15 minutes, d'une macromolécule biologique en solution avec des nanotubes de carbones fermés à leurs extrémités, dans les conditions de température et de pH convenables.			
<b>BEST AVAILABLE COPY</b>			

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Biélorus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## PROCEDE DE FIXATION ET/OU DE CRISTALLISATION DE MACROMOLECULES BIOLOGIQUES SUR DES NANOTUBES DE CARBONE ET SES APPLICATIONS.

La présente invention est relative à un procédé de fixation et/ou de  
5 cristallisation de macromolécules, aux réactifs chimiques mis en œuvre dans ledit  
procédé, aux produits obtenus ainsi qu'aux applications desdits produits dans le  
domaine des matériaux et de la biologie structurale, notamment comme biocapteurs ou  
comme biomatériaux.

La connaissance de la structure des protéines et notamment de leurs  
10 sites actifs est essentielle à la compréhension de leur mécanisme d'action. On dispose,  
pour réaliser de telles études, de plusieurs méthodes : rayons X, RMN, électro-  
cristallographie (cristallisation 2D).

Pour réaliser la cristallisation proprement dite, la technique de  
cristallisation bidimensionnelle sur monocouche ou film lipidique, à l'interface air/eau  
15 (E.E. Ugziris et al., Nature, 1983, 301, 125-129), permet la formation de systèmes  
auto-organisés de macromolécules biologiques (cristaux) et la détermination des  
structures de ces molécules par l'analyse par microscopie électronique des cristaux  
obtenus.

Cette méthode consiste à créer une monocouche lipidique au niveau  
20 d'une interface air/liquide, les lipides étant sélectionnés pour interagir avec les  
protéines, présentes dans la phase liquide, qui se fixent sur les lipides, puis forment un  
réseau organisé.

La fixation des protéines sur les lipides de la monocouche met en jeu  
des interactions chimiques au niveau de la tête polaire des lipides. Ces interactions  
25 sont soit aspécifiques, les lipides possédant des extrémités polaires chargées, donnant  
lieu à une cristallisation par interactions ioniques, soit spécifiques. Dans ce dernier  
cas, la tête polaire des lipides porte des ligands présentant une forte affinité avec les  
protéines à fixer.

---

En particulier, il a pu être montré que des protéines solubles peuvent  
30 cristalliser bidimensionnellement sur des films lipidiques chargés, ou fonctionnalisés  
par un ligand de la protéine étudiée (B.J. Jap et al., Ultramicroscopy, 1992, 46, 45-84).

Plus récemment, des lipides fonctionnalisés par des complexes métalliques tels que des complexes de nickel (E.W. Kubalek et al., J. Struct. Biol., 1994, 113, 117-123) ont permis de cristalliser des protéines de fusion dites étiquetées histidine. Ces protéines possèdent en effet, à leur extrémité N- ou C-terminale, une  
5 séquence composée de plusieurs histidines. Il a pu être montré que la fixation de telles protéines sur un lipide-nickel était due à une interaction forte entre le complexe nickel et la séquence poly-histidine (C. Vénien-Brian et al., J. Mol. Biol., 1997, 274, 687-692). De tels lipides fonctionnalisés ont permis d'obtenir une cristallisation, notamment dans les cas où l'on ne disposait pas du ligand approprié.

10 Toutefois, la cristallisation des protéines sur des films lipidiques présente l'inconvénient d'être relativement aléatoire et de dépendre de nombreux facteurs, qu'il est difficile de maîtriser simultanément :

- le ligand porté par les lipides doit être suffisamment accessible, pour pouvoir interagir avec les protéines. Cette accessibilité dépend de la longueur du  
15 bras espaceur entre le lipide et le ligand : trop court, il donne lieu à une pénétration de la protéine à l'intérieur de la couche lipidique ; trop long, il confère un trop grand degré de liberté à la protéine liée et augmente l'incidence des défauts dans le cristal ;

- la monocouche lipidique doit être suffisamment fluide pour conférer une mobilité latérale et rotationnelle suffisante à la protéine liée, permettant ainsi  
20 aux protéines de s'organiser les unes par rapport aux autres et de développer des contacts intermoléculaires, de façon à donner naissance au cristal ;

- une autre difficulté, inhérente à la cristallisation sur monocouche lipidique concerne la stabilité de la monocouche ; en effet, la stabilité de l'interface air/liquide est difficilement contrôlable. En outre, la monocouche lipidique doit rester  
25 stable, non seulement avant la fixation des protéines, mais aussi après leur fixation, pour permettre l'organisation spatiale des protéines ;

- pour l'étude microscopique, qui suit l'étape de cristallisation, il est nécessaire de réaliser une multitude de plans, du fait de la nature plane de la structure obtenue.

30 En conséquence, les Inventeurs se sont donné pour but de pourvoir à un procédé permettant de fixer en solution et éventuellement d'induire une auto-orga-

nisation de macromolécules qui réponde mieux aux besoins de la pratique que les méthodes de cristallisation 2D antérieurement utilisées.

La présente invention a pour objet un procédé de fixation et/ou d'auto-organisation de macromolécules biologiques, caractérisé en ce qu'il comprend  
5 essentiellement l'incubation, sans agitation, pendant au moins 15 minutes, d'une macromolécule en solution avec des nanotubes de carbone fermés à leurs extrémités, dans des conditions de température et de pH convenables.

Les nanotubes ont été découverts en 1991 (S. Iijima, *Nature* 1991, 354, 54-56) ; depuis, ils ont suscité un très grand intérêt, notamment en raison de leurs  
10 propriétés mécaniques : grande résistance mécanique (M. M. J. Treacy *et al.*, *Nature* 1996, 381, pp. 678-680) et électroniques : propriété de conducteur ou de semi-conducteur (J. W. G. Wildöer *et al.*, *Nature* 1998, 391, 59-62 ; T. W. Odom *et al.*, *Nature*, 1998, 391, 62-64).

Plusieurs procédés de préparation des nanotubes ont été décrits, dont  
15 celui de T. W. Ebbesen *et al.*, (*Nature*, 1992, 358, 220-222), qui permet d'obtenir un rendement élevé. Des méthodes de purification des nanotubes ont également été décrites (H. Hiura *et al.*, *Adv. Mater.*, 1995, 7, 275-276 ; J-M Bonard *et al.*, *Adv. Mater.*, 1997, 9, 827-831 et G. S. Duesberg *et al.*, *Chem. Commun.* 1998, 435-436) ; ces différentes méthodes permettent d'obtenir les quantités souhaitées de nanotubes.  
20 Des méthodes de fonctionnalisation chimique des nanotubes de carbone ont également été décrites (Demande Internationale PCT WO 97/32571).

D'autres méthodes de fonctionnalisation chimique des nanotubes ont également été décrites ; on peut citer par exemple TSANG S.C. *et al.*, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1995, 17, 1803-1804 et DAVIS J.J. *et al.*, *Inorganica Chimica Acta*, 1998, 272, 1, 2, 261-266.  
25

Toutefois, elles impliquent des réactions chimiques qui, soit modifient dramatiquement la géométrie des nanotubes (ouverture des extrémités, destruction partielle des feuillets externes), soit anéantissent les propriétés physiques intrin-  
sèques des nanotubes et par conséquent ne permettent pas une organisation de macro-  
30 molécules biologiques telles que les protéines, sur les nanotubes. Des nanotubes modifiés par de telles méthodes destructives ne sont donc pas adaptés à l'adsorption et/ou à

l'auto-organisation à leur surface extérieure de produits synthétiques ou de macromolécules biologiques.

Selon la technique et les conditions employées, plusieurs structures de nanotubes peuvent être préparées : les nanotubes présentent notamment des structures dites en multi-feuillets (MWNT) ou en mono-feuillets (SWNT) de graphite. Ils peuvent être complètement, partiellement ou pas du tout oxydés.

Ainsi, les nanotubes sont, d'un point de vue chimique, des polymères composés uniquement de carbone et pouvant comporter jusqu'à un million d'atomes. Conformément aux lois de la chimie du carbone, les atomes d'un nanotube sont reliés par l'intermédiaire d'une solide liaison covalente et chaque atome possède exactement trois voisins. Ainsi quelle que soit sa longueur, un nanotube est obligé de se fermer à ses extrémités, de manière à n'y laisser aucune liaison chimique seule. Généralement son diamètre est généralement compris entre 1 et 30 nm et sa longueur peut atteindre plusieurs micromètres.

D'un point de vue physique, les nanotubes peuvent être définis comme des cristaux de carbone s'étendant dans une seule direction, le motif répétitif ayant la symétrie d'une hélice (B.I. Yakobson et al., American Scientist, 1997, 85, 324-337).

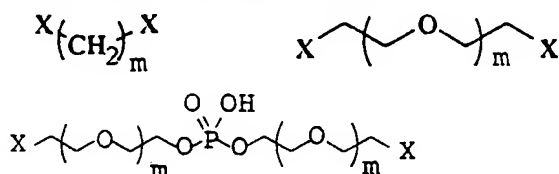
Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, lesdites macromolécules biologiques sont notamment des protéines solubles, membranaires, trans-membranaires, des enzymes, des anticorps, des fragments d'anticorps ou des acides nucléiques.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, lesdits nanotubes de carbone sont fonctionnalisés par adsorption physique d'un réactif chimique de formule générale **H-E-L**, dans laquelle :

- **H** représente un groupe hydrophile, sélectionné parmi les groupes chargés positivement ou négativement ; des ligands ou analogues de macromolécules biologiques, tels que de manière non limitative, la biotine, la novobiocine, l'acide rétinique, les stéroïdes, des antigènes ; des complexes organométalliques interagissant avec des acides aminés ou des acides nucléiques, tels que les complexes de cuivre, de zinc, de nickel, de cobalt, de chrome, de platine, de palladium, de fer, de ruthénium ou

d'osmium avec des ligands comme IDA, NTA, EDTA, bipyridine ou terpyridine, lesdits ligands étant éventuellement fonctionnalisés par des groupements alkyles de liaison à E (au niveau de X) ; on entend par groupes chargés positivement ou négativement et ce, de manière non limitative : ammoniums, carboxylates, phosphates, sulfonates ; on peut citer par exemple les groupes suivants :  $-N(CH_3)_3^+$  ou  $-CO_2^-$ .

- E représente un bras espaceur, sélectionné parmi des chaînons carbonés en C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, éventuellement substitués par des groupes alkyles ou non, présentant des insaturations ou des motifs poly-oxyéthylène pouvant présenter ou non en milieu de chaîne des groupes phosphate, tels que :

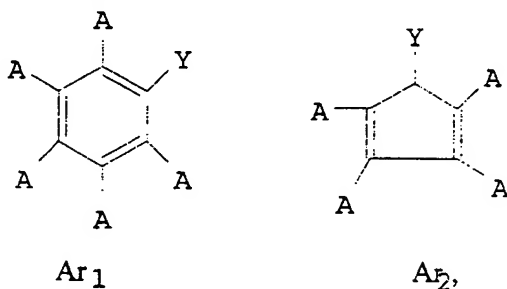


dans lesquels :

m représente un nombre entier de 1 à 10.

X représente O, NHCO, OCO, COO, CONH, S, CH<sub>2</sub> ou NH et constitue aux extrémités desdits chaînons carbonés des fonctions organiques d'accrochage du type esters, amides, éthers, thioéthers ;

- L représente un motif lipidique à une ou plusieurs chaînes de longueur variable, en C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> présentant ou non des insaturations ; un groupe aromatique de formule Ar<sub>1</sub> ou de formule Ar<sub>2</sub> :



dans lesquelles :

~~A représente un atome d'hydrogène, l'un des groupes suivants :~~  
alkyle, CF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, OH, O-alkyle, S-alkyle, COOH, halogène, un cycle aromatique  
ou un hétérocycle aromatique en C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>, éventuellement polysubstitué par des groupes

électrodonneurs de type alkyle ou électroattracteurs de type  $\text{CF}_3$  ou halogénures ; L représente par exemple l'un des groupes aromatiques suivants : benzyle, naphtyle, anthracényle, fluorényle, tétrabenzofluorényle et

Y représente une liaison à E.

5 On entend, au sens de la présente invention, par alkyle, des groupes alkyles en  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ , linéaires ou ramifiés ou éventuellement substitués.

De manière surprenante, aussi bien les nanotubes de carbone non traités (non fonctionnalisés) que les nanotubes de carbone fonctionnalisés par des méthodes non destructives, tels que définis ci-dessus, sont utilisables dans le procédé  
10 selon l'invention.

La fonctionnalisation selon la présente invention est, de manière surprenante, non destructive pour les nanotubes ; en particulier, elle évite l'ouverture de leurs extrémités.

Il est possible avec un tel procédé d'adsorber et/ou d'auto-organiser  
15 à la surface extérieure des nanotubes de carbone soit des produits synthétiques, soit des macromolécules biologiques.

En effet, la présente invention permet d'induire la formation d'arrangements de macromolécules (auto-organisation) telles que des protéines, avec une symétrie hélicoïdale.

20 Selon un autre mode de mise en œuvre dudit procédé, ladite solution est constituée d'un solvant de solubilisation desdites macromolécules biologiques, aqueux ou hydroalcoolique et contenant éventuellement au moins un détergent, en fonction de la macromolécule biologique à cristalliser.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, les  
25 conditions d'incubation sont de préférence les suivantes : incubation à température ambiante, pendant 15 minutes à 48 heures, à un pH compris entre 5,5 et 8,5.

De manière surprenante, ledit procédé permet d'obtenir des arrangements de macromolécules biologiques permettant des études structurales par microscopie électronique et la préparation de nouveaux nano-matériaux utilisables pour leur  
30 propriétés physiques, électriques, ou biologiques.

Un tel procédé a l'avantage de rendre la cristallisation des protéines



reproductibles ; en particulier, il est aisé, dans le cas où une protéine ne cristallise pas en présence de nanotubes d'un diamètre donné, de mettre en œuvre le procédé avec des nanotubes de diamètre différent ; en effet, la cristallisation d'une protéine donnée est fonction du diamètre des nanotubes.

5 Or, dans la présente invention, il est possible de faire varier le diamètre des nanotubes et d'utiliser aussi bien des nanotubes de carbone multi-feuillets ou mono-feuillets, complètement, partiellement ou pas du tout oxydés.

Également de manière surprenante, dans le procédé selon l'invention, la fixation ou la cristallisation de macromolécules sur des nanotubes de  
10 carbone peut être, dans les conditions expérimentales appropriées, telles que définies ci-dessus, soit spontanées, c'est à dire en l'absence de tout autre produit synthétique, soit induites par addition d'un réactif chimique H-E-L, tel que défini ci-dessus.

Également de manière surprenante, les différents facteurs qui peuvent intervenir pour permettre une cristallisation reproductible sont, comme déjà  
15 précisés ci-dessus, les suivants : la concentration des échantillons, le choix des solvants, la force ionique, le pH des solutions, le temps d'incubation et le diamètre des nanotubes.

Aussi bien les réactifs dans lesquels L représente un motif lipidique à une ou plusieurs chaînes de longueur variable en  $C_{12}$ - $C_{20}$  présentant ou non des  
20 insaturations que les réactifs dans lesquels L représente un groupe aromatique de formule  $Ar_1$  ou de formule  $Ar_2$ , permettent d'obtenir des nanotubes fonctionnalisés adaptés à l'arrangement de macromolécules à leur surface ; toutefois, les réactifs dans lesquels L représente un groupe aromatique de formule  $Ar_1$  ou de formule  $Ar_2$  sont particulièrement préférés.

25 La présente invention a également pour objet des bionanomatériaux, caractérisés en ce qu'ils sont essentiellement constitués de nanotubes de carbone, sur lesquels des macromolécules biologiques sont fixées de manière non-covalente.

La présente invention a également pour objet des bionanomatériaux, caractérisés en ce qu'ils sont essentiellement constitués de nanotubes de carbone, sur  
30 lesquels des macromolécules biologiques sont auto-organisées sous une forme cristalline.

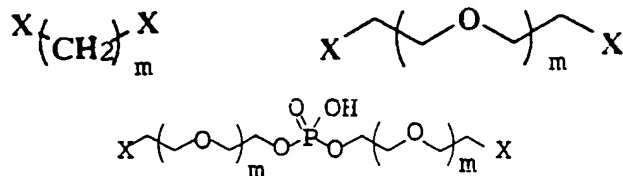
Selon un mode de réalisation avantageux desdits bionanomatériaux ils sont obtenus à l'aide d'un procédé tel que défini ci-dessus.

La présente invention a, en outre pour objet les applications desdits bionanomatériaux, à l'étude structurale des macromolécules biologiques qui leur sont associées, en tant que réactif biologique et plus particulièrement en tant que réactif immunologique et en tant que biocapteurs ou bioconducteurs.

La présente invention a, en outre, pour objet un réactif chimique apte à être adsorbé physiquement sur des nanotubes de carbone, caractérisé en ce qu'il présente la formule générale H-E-L, dans laquelle :

10 - H représente un groupe hydrophile, sélectionné parmi les groupes chargés positivement ou négativement ; des ligands ou analogues de macromolécules biologiques ; des complexes organométalliques interagissant avec des acides aminés ou des acides nucléiques et dont les ligands sont éventuellement fonctionnalisés par des groupements alkyles de liaison à E ;

15 - E représente un bras espaceur, sélectionné parmi des chaînons carbonés en C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, éventuellement substitués par des groupes alkyles, présentant ou non des insaturations ou des motifs poly-oxyéthylène pouvant présenter ou non en milieu de chaîne des groupes phosphate, tels que :

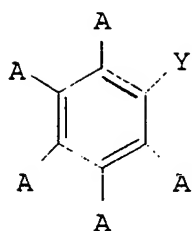
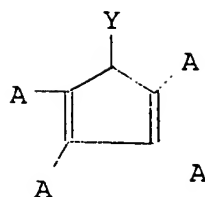


20 dans lesquels :

m représente un nombre entier de 1 à 10,

X représente O, NHCO, OCO, COO, CONH, S, CH<sub>2</sub> ou NH et constitue aux extrémités desdits chaînons carbonés des fonctions organiques d'accrochage du type esters, amides, éthers, thioéthers ;

25 - L représente un groupe aromatique de formule Ar<sub>1</sub> ou de formule Ar<sub>2</sub> :

Ar<sub>1</sub>Ar<sub>2</sub>,

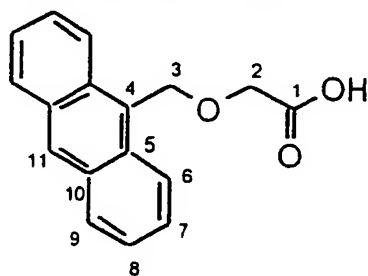
dans lesquelles :

A représente un atome d'hydrogène, l'un des groupes suivants :

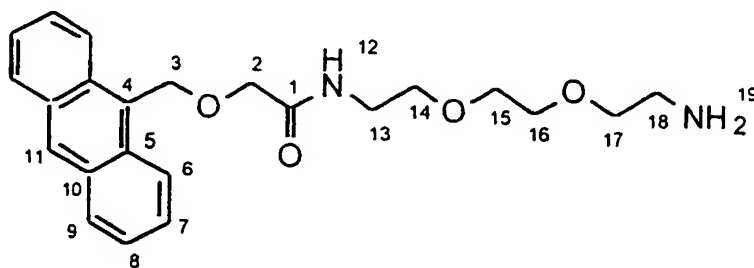
- 5 alkyle, CF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, OH, O-alkyle, S-alkyle, COOH, halogène, un cycle aromatique ou un hétérocycle aromatique en C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>, lesdits cycles étant éventuellement poly-substitués par des groupes électrodonneurs de type alkyle ou électroattracteurs de type CF<sub>3</sub> ou halogénures ; et

Y représente une liaison à E.

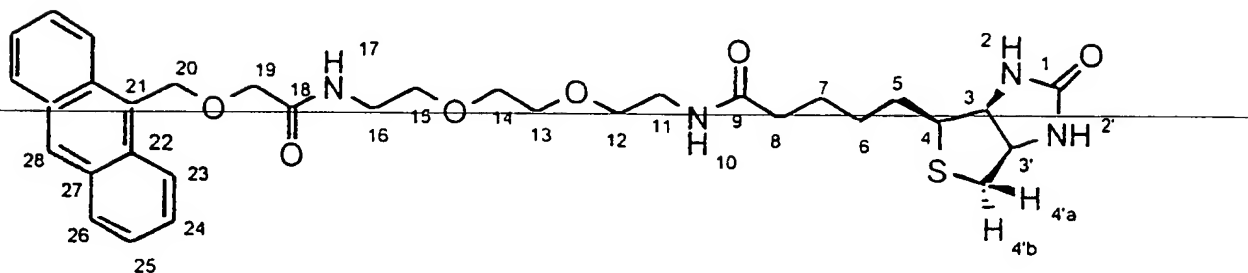
- 10 Selon un mode de réalisation avantageux dudit réactif chimique, il présente l'une des structures suivantes :



1,

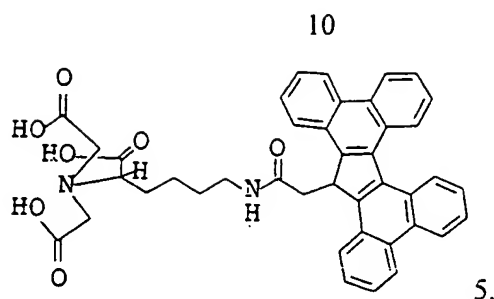


3,

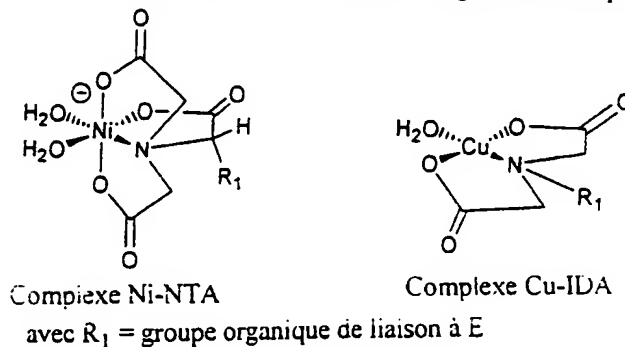


4,

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit réactif chimique, H est sélectionné parmi les complexes organométalliques suivants :



- 5                      Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfèrent à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :
- la figure 1 illustre la cristallisation d'une macromolécule biologique sur un nanotube de carbone, par addition (adsorption physique) d'un réactif chimique ;
  - 10                      - la figure 2 illustre une structure de réactif chimique utilisé pour fonctionnaliser par adsorption physique les nanotubes de carbone ;
  - la figure 3 représente des nanotubes d'un diamètre proche de 10 nm, couverts de cristaux hélicoïdaux de streptavidine ;
  - 15                      - la figure 4 représente des nanotubes couverts de cristaux hélicoïdaux de protéine HupR.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

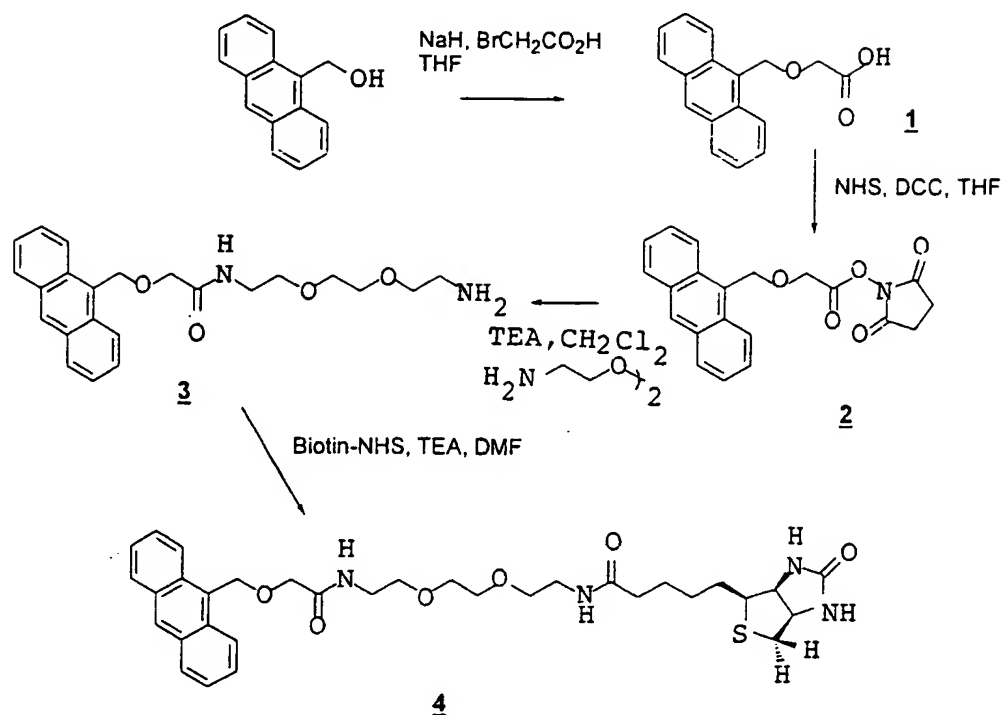
20

**Exemple 1 : Auto-organisation sur des nanotubes de carbone multi-feuillets de molécules de streptavidine en cristaux hélicoïdaux.**

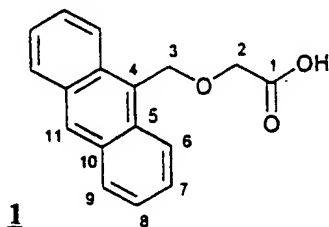
Les nanotubes de carbones multi-feuillets (MWNT) utilisés sont produits par décomposition d'une électrode de graphite par un arc-électrique (T. W. Ebbesen *et al*, *Nature* 1992, vol 358, pp. 220-222). Après sonication d'une solution (2 mg/ml) de nanotubes de carbones, 20 µg de MWNT sont prélevés et séchés par un courant d'éthane-gaz pour être finalement remis en suspension dans 20 µl d'un mélange eau/méthanol (40% de méthanol en volume). Après sonication, 20 µl d'une solution aqueuse de streptavidine (10 µg/ml) sont additionnés et l'ensemble est laissé, sans agitation ni vortex, à température ambiante pendant 45 minutes. 5 µl de la suspension de nanotubes de carbone sont alors déposés sur une grille de microscopie électronique recouverte d'un film de carbone. Après une coloration négative de l'échantillon par une solution d'acétate d'uranyle, la grille est observée dans un microscope électronique (Philips CM120). Il a pu être confirmé que les nanotubes d'un diamètre proche de 10 nm sont couverts de cristaux hélicoïdaux de streptavidine.

**Exemple 2 : Auto-organisation sur des nanotubes de carbone multi-feuillets de molécules de HupR "étiquetée-histidine" en cristaux hélicoïdaux.**

Les nanotubes de carbones multi-feuillets (MWNT) utilisés sont produits par décomposition d'une électrode de graphite par un arc électrique (T. W. Ebbesen *et al*, *Nature* 1992, vol 358, pp. 220-222). Après sonication d'une solution (2 mg/ml) de nanotubes de carbones, 20 µg de MWNT sont prélevés et séchés par un courant d'éthane gaz pour être finalement remis en suspension dans 20 µl d'un tampon aqueux (Tris 10 mM ; pH = 7,5 ; NaCl 350 mM). Après sonication, 20 µl d'une solution aqueuse de protéine HupR étiquetée-histidine (10 µg/ml) du *Rhodobacter Capsulatus* sont additionnés et l'ensemble est laissé, sans agitation ni vortex, à température ambiante pendant 25 minutes. 5 µl de la suspension de nanotubes de carbone sont alors déposés sur une grille de microscopie électronique recouverte d'un film de carbone. Après une coloration négative de l'échantillon par une solution d'acétate d'uranyle, la grille est observée dans un microscope électronique (Philips CM120). Il a pu être noté qu'un grand nombre de nanotubes sont couverts de cristaux hélicoïdaux de protéine HupR.

**Exemple 3 : Préparation d'un réactif chimique biotinylé.****Schéma de synthèse****Protocole expérimental**

5

**Acide (anthracèn-9-ylméthoxy)-acétique 1 :****MODE OPERATOIRE**

A une suspension de 1,2 g (30 mmol, 3 équ.) d'hydruure de sodium à 60 % dans l'huile dans 20 ml de THF sont ajoutés à 0 °C 2,1g (10 mmol, 1 équ.) de 9-anthracényl méthanol dans 20 ml de THF. Le mélange est agité pendant une heure à reflux, puis la température est abaissée à 0 °C pour ajouter 1,4 g (10 mmol, 1 équ.) d'acide bromoacétique en solution dans 20 ml de THF. La solution est agitée encore 5 minutes à 0 °C, puis une heure à température ambiante avant d'être portée à reflux pendant 16 heures. Après refroidissement, la réaction est stoppée par addition de 40

ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure d'ammonium suivie de 10 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique. Le milieu réactionnel est alors extrait avec 2 x 50 ml d'éther. Après séchage sur sulfate de sodium, la phase organique est évaporée à sec pour fournir après chromatographie sur silice (Hexane/EtOAc/AcOH ; 70/30/1)

5 1,212 g d'un solide jaune (Rdt : 45,5 %).

FB : C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>

PM : 266,299 g/mol

CCM : R<sub>f</sub> (EtOAc/Hex/AcOH ; 80/20/1) : 0,56 ;

RMN <sup>1</sup>H (300,13 MHz, Acétone d<sub>6</sub>) : δ 11,2 (bs, 1H, H<sub>1</sub>) ; 8,64 et 8,10 (d et d, 4H, J = 8,8 Hz, J = 7,9 Hz, H<sub>6</sub>, H<sub>9</sub>) ; 8,61 (s, 1H, H<sub>11</sub>) ; 7,5 - 7,7 (m, 4H, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>) ; 5,68 (s,

10 2H, H<sub>3</sub>) ; 4,41 (s, 2H, H<sub>2</sub>) ;

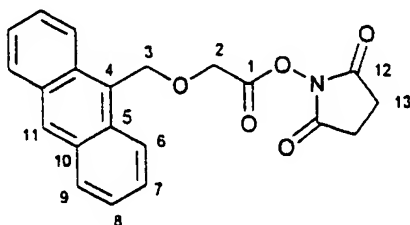
RMN <sup>13</sup>C (75,47 MHz, Acétone d<sub>6</sub>) : δ 176,27 (1C, C<sub>1</sub>) ; 136,51, 136,16 et 133,29 (5C, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>10</sub>) ; 133,75, 131,10, 130,14 et 129,73 (9C, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>11</sub>) ; 71,88 (1C, C<sub>3</sub>) ; 69,81 (1C, C<sub>2</sub>) ;

SM (70eV/DCl/intensité %) : m/e : 191 (100, [M-OCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>) ; 266 (12,

15 [M+1]<sup>+</sup>) ; 284 (58, [M+18]<sup>+</sup>) ;

(Anthracèn-9-ylméthoxy)-acétate de 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yle

2 :



20

2

## MODE OPERATOIRE

A une solution de 650 mg (2,44 mmol, 1 éq) d'acide (anthracèn-9-ylméthoxy)-acétique 1 et 300 mg de NHS (2,61 mmol, 1,07 éq.) dans 30 ml de THF sont ajoutés à 0 °C 510 mg (2,47 mmol, 1 éq) de DCC en solution dans 20 ml de THF.

25 Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante. Le milieu réactionnel est alors filtré, puis évaporé. Le résidu obtenu est repris dans 50 ml d'éthanol absolu pour fournir après filtration 727 mg d' (anthracèn-9-ylméthoxy)-acétate de 2,5-dioxo-

pyrrolidin-1-yle 2 sous la forme d'un solide blanc (Rdt : 82%).

FB : C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>

PM : 363,374 g/mol

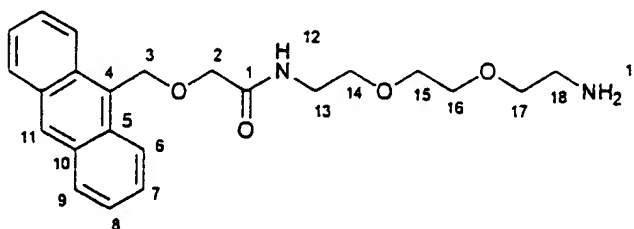
CCM : Rf (EtOAc/Hex ; 50/50) : 0,33 ;

RMN <sup>1</sup>H (300,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 8,51 (s, 1H, H<sub>11</sub>) ; 8,42 et 8,02 (d et d, 4H, J = 9,0 Hz, J = 8,4 Hz, H<sub>6</sub>, H<sub>9</sub>) ; 7,59 et 7,48 (dd et dd, 4H, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>) ; 5,71 (s, 2H, H<sub>3</sub>) ; 4,53 (s, 2H, H<sub>2</sub>) ; 2,90 (s, 4H, H<sub>13</sub>) ;

RMN <sup>13</sup>C (75,47 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 168,49 (2C, C<sub>12</sub>) ; 166,16 (1C, C<sub>1</sub>) ; 131,13 , 128,94 et 126,36 (5C, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>10</sub>) ; 128,82, 126,51 , 124,88 et 123,83 (9C, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>11</sub>) ; 65,28 (1C, C<sub>3</sub>) ; 64,57 (1C, C<sub>2</sub>) ; 25,39 (2C, C<sub>13</sub>) ;

10 SM (70eV/DCI/intensité %) : m/e : 381 (100, [M+18]<sup>+</sup>) ;

*N*-{2-[2-(2-Amino-éthoxy)-éthoxy]-éthyl}-2-(anthracèn-9-ylméthoxy)-acétamide 3 :



15

### MODE OPERATOIRE

A une solution de 370 mg (2,50 mmol, 10 éq.) de 2,2'-(éthylènedioxy)-diéthylamine dans 20 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont ajoutés 1,75 ml de TEA et 91 mg (0,25 mmol, 1 éq.) de (anthracèn-9-ylméthoxy)-acétate de 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yle 2 en solution dans 5 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le mélange est agité pendant 7 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est alors évaporé. Le résidu obtenu est lavé avec 50 ml d'eau puis 50 ml d'une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (0,1 N). La phase organique est séchée, évaporée et concentrée sous vide pour fournir après chromatographie sur silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/TEA ; 90/10/1), 55 mg de *N*-{2-[2-(2-Amino-éthoxy)-éthoxy]-éthyl}-2-(anthracèn-9-ylméthoxy)-acétamide 3 sous la forme d'une huile jaune (Rdt : 55%).

FB : C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

PM : 396,491 g/mol



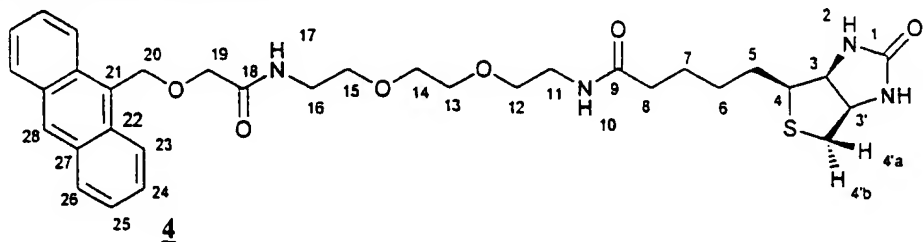
CCM : Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/TEA ; 90/10/1) : 0,28 ;

RMN <sup>1</sup>H (300,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 8,44 (s, 1H, H<sub>11</sub>) ; 8,29 et 7,98 (d et d, 4H, J = 9,0 Hz, J = 8,4 Hz, H<sub>6</sub>, H<sub>9</sub>) ; 7,53 et 7,45 (dd et dd, 4H, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>) ; 6,93 (t, 1H, J<sub>6-9</sub> = 5,4 Hz, 1H, H<sub>12</sub>) ; 5,51 (s, 2H, H<sub>3</sub>) ; 4,13 (s, 2H, H<sub>2</sub>) ; 3,3 - 3,5 (m, 8H, H<sub>14</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub>) ; 3,25 (t, J = 5,1 Hz, 2H, H<sub>13</sub>) ; 2,7 - 2,8 (m, 2H, H<sub>19</sub>) ; 2,64 (t, 2H, J = 5,1 Hz, H<sub>18</sub>) ;

RMN <sup>13</sup>C (75,47 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 169,49 (1C, C<sub>1</sub>) ; 131,11, 130,73 et 127,08 (5C, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>10</sub>) ; 128,92, 128,69, 126,39, 124,87 et 123,64 (9C, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>11</sub>) ; 72,10, 69,89, 69,78, 69,47 et 69,33 (5C, C<sub>3</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub>) ; 65,15 (1C, C<sub>2</sub>) ; 41,03 (1C, C<sub>13</sub>) ; 38,31 (1C, C<sub>18</sub>) ;

SM (70eV/DCl/intensité %) : m/e : 397 (100, [M+1]<sup>+</sup>) ;

*N*-{2-[2-(2-(Amino-biotine)-éthoxy)-éthoxy]-éthyl}-2-(anthracèn-9-ylméthoxy)-acétamide **4**:



#### MODE OPERATOIRE

A une solution de 40 mg (0,1 mmol, 1 éq.) de *N*-{2-[2-(2-amino-éthoxy)-éthoxy]-éthyl}-2-(anthracèn-9-ylméthoxy)-acétamide **3** dans 5 ml de DMF sont ajoutés 1 ml de TEA et 40 mg (0,12 mmol, 1,2 éq) de biotin-NHS en solution dans 5 ml de DMF. Le mélange est agité pendant 16 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est concentré sous vide pour fournir après chromatographie sur silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/TEA ; 95/5/1), 55 mg de *N*-{2-[2-(2-(amino-biotine)-éthoxy)-éthoxy]-éthyl}-2-(anthracèn-9-ylméthoxy)-acétamide **4**: sous la forme d'une huile jaune (Rdt : 89%).

FB : C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S

PM : 622,793 g/mol

CCM : Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH ; 90/10) : 0,5 ;

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

RMN  $^1\text{H}$  (300,13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  8,48 (s, 1H, H<sub>28</sub>) ; 8,31 et 7,01 (d et d, 4H, J = 9,0 Hz, J = 8,4 Hz, H<sub>23</sub>, H<sub>26</sub>) ; 7,55 et 7,47 (dd et dd, 4H, H<sub>24</sub>, H<sub>25</sub>) ; 6,89 (t, 1H, J<sub>16-17</sub> = 5,0 Hz, H<sub>17</sub>) ; 6,90 (s, 1H, H<sub>2</sub>) ; 6,53 (t, 1H, J<sub>10-11</sub> = 5,0 Hz, H<sub>10</sub>) ; 5,67 (s, 1H, H<sub>2'</sub>) ; 5,55 (s, 2H, H<sub>20</sub>) ; 4,31 (m, 1H, H<sub>3</sub>) ; 4,17 (s, 2H, H<sub>19</sub>) ; 4,15 (m, 1H, H<sub>3'</sub>)† ; 3,2 - 3,5 (m, 12H, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>16</sub>) ; 2,97 (dt, 2H, H<sub>4</sub>) ; 2,75 (dt, 1H, J<sub>3'-4'a</sub> = 4,8 Hz, J<sub>4'a-4'b</sub> = 12,7 Hz, H<sub>4'a</sub>) ; 2,2 (d, 1H, J<sub>4'a-4'b</sub> = 12,7 Hz, H<sub>4'b</sub>) ; 2,08 (t, 2H, J<sub>7-8</sub> = 7,4 Hz, H<sub>8</sub>) ; 1,2 - 1,7 (m, 6H, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>) ;

RMN  $^{13}\text{C}$  (75,47 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  173,00 (1C, C<sub>1</sub>) ; 169,56 (1C, C<sub>18</sub>) ; 163,76 (1C, C<sub>9</sub>) ; 131,14 , 130,73 et 127,05 (5C, C<sub>21</sub>, C<sub>22</sub>, C<sub>27</sub>) ; 128,98, 128,75 , 126,45 , 124,93 et 123,59 (9C, C<sub>23</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>25</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>28</sub>) ; 69,74 , 69,55 , 69,23 et 65,25 (6C, C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>19</sub>, C<sub>20</sub>) ; 61,50 et 59,88 (2C, C<sub>3</sub>, C<sub>3'</sub>) ; 55,32 (1C, C<sub>4</sub>) ; 40,18 (1C, C<sub>4'</sub>) ; 38,76 , 38,33 et 35,65 (3C, C<sub>8</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>16</sub>) ; 27,95 et 27,81 (2C, C<sub>5</sub>, C<sub>7</sub>) ; 25,30 (1C, C<sub>6</sub>) ;

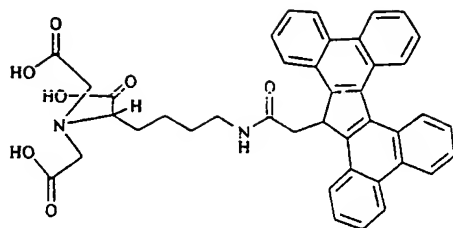
SM (70eV/DCI/intensité %) : m/e : 623 (100, [M+1]<sup>+</sup>) ; 640 (8, [M+18]<sup>+</sup>) ;

**Exemple 4 : Adsorption physique sur des nanotubes de carbone d'un réactif chimique, dénommé ci-après CR174, de structure H-E-L**

Protocole : A 20  $\mu\text{l}$  d'une solution de nanotubes de carbone (10 mg/ml dans le méthanol), fraîchement soniquée, sont ajoutés 1 à 20  $\mu\text{l}$  d'une solution de réactif chimique, dénommé CR174 et dont la formule chimique est illustrée ci-après, (1mg/ml) dans du méthanol. Le mélange est alors agité par sonication puis évaporé à sec par un courant d'éthane gaz. 40  $\mu\text{l}$  de tampon Tris (20 mM, pH 7,5 ; NaCl 50 mM) sont ajoutés aux nanotubes de carbone secs et la suspension est remélangée par sonication. La suspension peut éventuellement être centrifugée et lavée plusieurs fois avec 500  $\mu\text{l}$  de tampon pour éliminer l'excès de réactif non-adsorbé sur les nanotubes de carbone.

L'adsorption physique du réactif CR174 sur les nanotubes de carbone a pu être mise en évidence par microscopie électronique en coloration positive. La présence de molécules de réactifs sur les nanotubes de carbone se traduit par l'apparition de points noirs. Ces points noirs sont absents en l'absence de réactif

chimique CR174 (ou 5).



- 5                    Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Procédé de fixation et/ou d'auto-organisation de macromolécules biologiques, caractérisé en ce qu'il comprend essentiellement l'incubation, sans agitation, pendant au moins 15 minutes, d'une macromolécule biologique en solution avec  
 5 des nanotubes de carbone fermés à leurs extrémités, dans des conditions de température et de pH convenables.

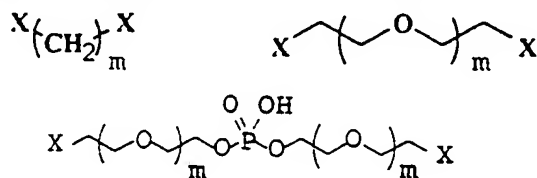
2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdites macromolécules biologiques sont notamment des protéines solubles, membranaires, trans-membranaires, des enzymes, des anticorps, des fragments d'anticorps ou des  
 10 acides nucléiques.

3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que lesdits nanotubes de carbone sont fonctionnalisés par adsorption physique, à leur surface, d'un réactif chimique de formule générale **H-E-L**,

dans laquelle :

15 - **H** représente un groupe hydrophile, sélectionné parmi les groupes chargés positivement ou négativement ; des ligands ou analogues de macromolécules biologiques ; des complexes organométalliques interagissant avec des acides aminés ou des acides nucléiques et dont les ligands sont éventuellement fonctionnalisés par des groupements alkyles de liaison à E ;

20 - **E** représente un bras espaceur, sélectionné parmi des chaînons carbonés en C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, éventuellement substitués par des groupes alkyles, présentant ou non des insaturations ou des motifs poly-oxyéthylène pouvant présenter ou non en milieu de chaîne des groupes phosphate, tels que :



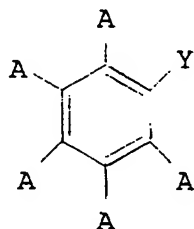
25 dans lesquels :

m représente un nombre entier compris entre 1 et 10,

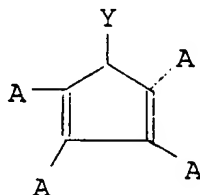
X représente O, NHCO, OCO, COO, CONH, S, CH<sub>2</sub> ou NH et constitue aux extrémités desdits chaînons carbonés des fonctions organiques d'accro-

chage du type esters, amides, éthers, thioéthers ;

- L représente un motif lipidique à une ou plusieurs chaînes de longueur variable, en  $C_{12}$ - $C_{20}$  présentant ou non des insaturations ; un groupe aromatique de formule  $Ar_1$  ou de formule  $Ar_2$  :



$Ar_1$



$Ar_2$

dans lesquelles :

A représente un atome d'hydrogène, l'un des groupes suivants : alkyle,  $CF_3$ ,  $NO_2$ ,  $NH_2$ , OH, O-alkyle, S-alkyle,  $COOH$ , halogène, un cycle aromatique ou un hétérocycle aromatique en  $C_4$ - $C_6$ , éventuellement polysubstitué par des groupes électrodonneurs de type alkyle ou électroattracteurs de type  $CF_3$  ou halogénures ; et

Y représente une liaison à E.

4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite solution est constituée d'un solvant de solubilisation desdites macromolécules biologiques, aqueux ou hydroalcoolique et contenant éventuellement au moins un détergent.

5°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les conditions d'incubation sont de préférence les suivantes : incubation à température ambiante, pendant 15 minutes à 48 heures, à un pH compris entre 5,5 et 8,5.

6°) Bionanomatériaux, caractérisés en ce qu'ils sont essentiellement constitués de nanotubes de carbone, sur lesquels des macromolécules biologiques sont fixées de manière non-covalente.

7°) Bionanomatériaux, caractérisés en ce qu'ils sont essentiellement constitués de nanotubes de carbone, sur lesquels des macromolécules biologiques sont auto-organisées sous une forme cristalline.

8°) Bionanomatériaux selon la revendication 6 ou la revendication 7,

caractérisés en ce qu'ils sont obtenus à l'aide d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

9°) Application des bionanomatériaux selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, à l'étude structurale des macromolécules biologiques qui leur sont associées.

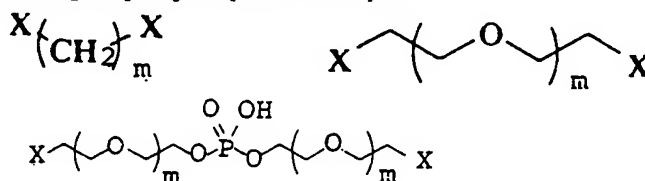
10°) Application des bionanomatériaux selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, en tant que réactif biologique.

11°) Application des bionanomatériaux selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, en tant que biocapteurs ou bioconducteurs.

12°) Réactif chimique apte à être adsorbé physiquement sur des nanotubes de carbone, caractérisé en ce qu'il présente la formule générale **H-E-L**, dans laquelle :

- **H** représente un groupe hydrophile, sélectionné parmi les groupes chargés positivement ou négativement ; des ligands ou analogues de macromolécules biologiques ; des complexes organométalliques interagissant avec des acides aminés ou des acides nucléiques et dont les ligands sont éventuellement fonctionnalisés par des groupements alkyles de liaison à E ;

- **E** représente un bras espaceur, sélectionné parmi des chaînons carbonés en  $C_1$ - $C_{10}$ , éventuellement substitués par des groupes alkyles, présentant ou non des insaturations ou des motifs poly-oxyéthylène pouvant présenter ou non en milieu de chaîne des groupes phosphate, tels que :

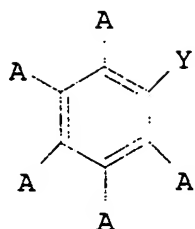
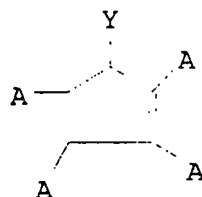


dans lesquels :

m représente un nombre entier de 1 à 10,

X représente O, NHCO, OCO, COO, CONH, S,  $\text{CH}_2$  ou NH et constitue aux extrémités desdits chaînons carbonés des fonctions organiques d'accrochage du type esters, amides, éthers, thioéthers ;

- **L** représente un groupe aromatique de formule  $\text{Ar}_1$  ou de formule

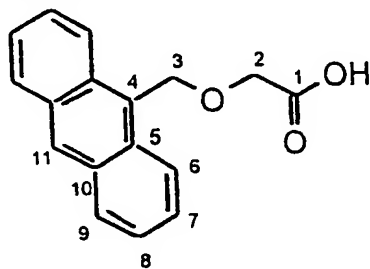
Ar<sub>2</sub> :Ar<sub>1</sub>Ar<sub>2</sub>

dans lesquelles :

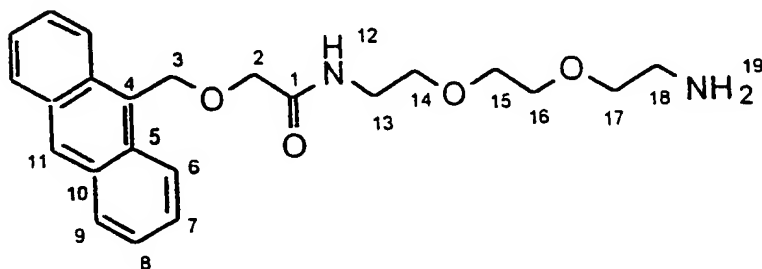
- 5 A représente un atome d'hydrogène, l'un des groupes suivants : alkyle, CF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, OH, O-alkyle, S-alkyle, COOH, halogène, un cycle aromatique ou un hétérocycle aromatique en C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>, lesdits cycles étant éventuellement poly-substitués par des groupes électrodonneurs de type alkyle ou électroattracteurs de type CF<sub>3</sub> ou halogénures ; et

- 10 Y représente une liaison à E.

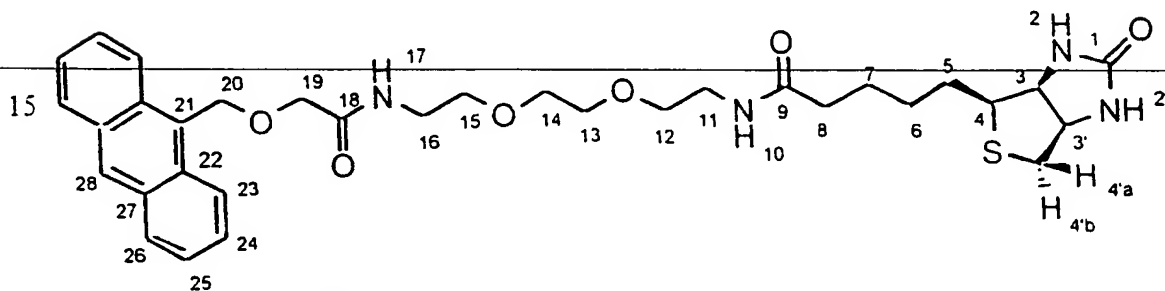
13°) Réactif chimique selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il présente l'une des structures suivantes :



1,

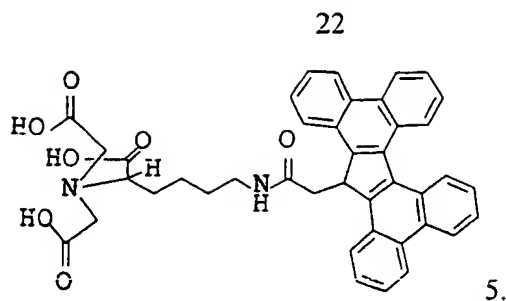


3,

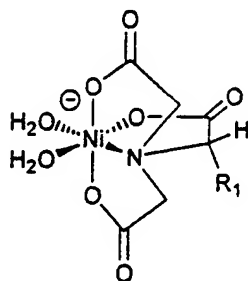


4,

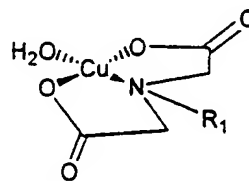
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)



14°) Réactif chimique selon la revendication 12, caractérisé en ce que H est sélectionné parmi les complexes organométalliques suivants :



Complexe Ni-NTA

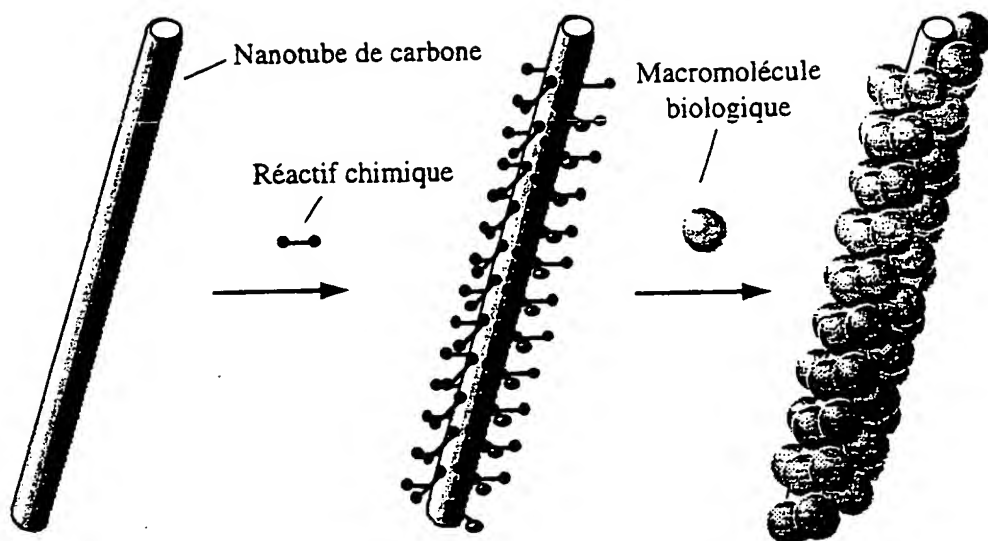


Complexe Cu-IDA

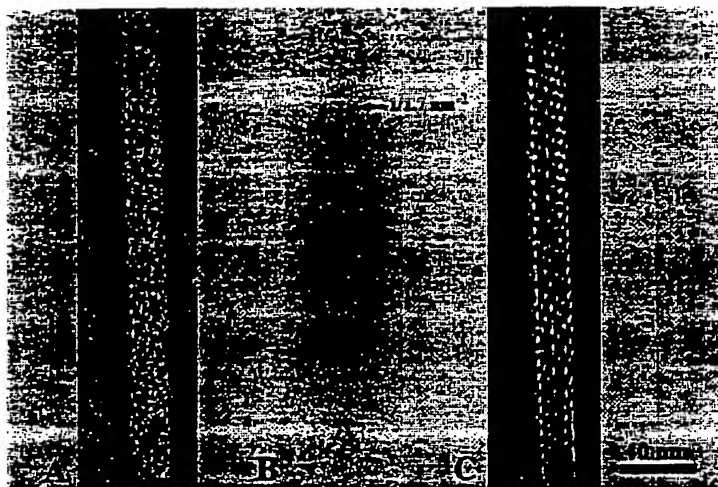
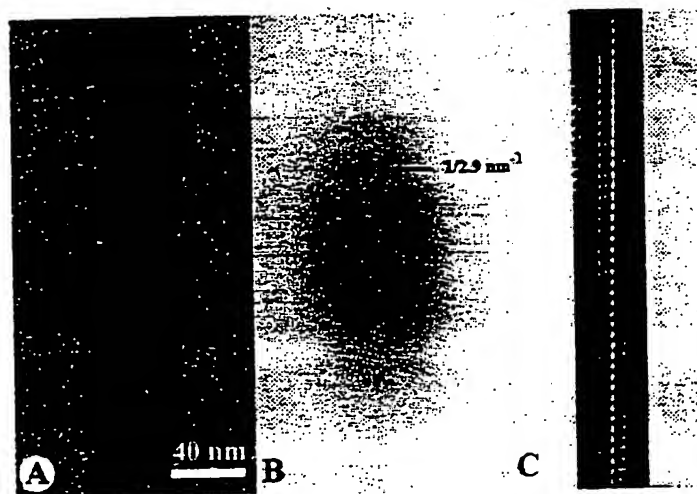
avec  $R_1$  = groupe organique de liaison à E



1 / 2

FIGURE 1FIGURE 2

2/2

FIGURE 3FIGURE 4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 99/01086

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/543 G01N33/547 C12N11/06 C07C235/20 C07D495/04  
C07C233/40 C07F1/00 C07F15/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C07C C07D C07F C30B C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 32571 A (HYPERION CATALYSIS INT ; FISCHER ALAN (US); HOCH ROBERT (US); MOY D) 12 September 1997 (1997-09-12) cited in the application page 1, line 8-19 page 9, line 13-18 page 25, line 27 - page 26, line 14 page 29 - page 31; examples 11,12 claim 31  --- -/--	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  18 August 1999	Date of mailing of the international search report  25/08/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  La Gaetana, R

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 99/01086

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TSANG SC ET AL: "Immobilization of small proteins in carbon nanotubes: high-resolution transmission electron microscopy study and catalytic activity" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS, vol. 17, 1995, pages 1803-1804, XP002096861 cited in the application the whole document</p> <p>---</p>	1,2
A	<p>DAVIS JJ ET AL: "The immobilization of proteins in carbon nanotubes" INORGANICA CHIMICA ACTA, vol. 272, no. 1,2, 1998, pages 261-266, XP002096862 cited in the application abstract page 262, paragraph 2.1 - paragraph 2.2.2</p> <p>---</p>	1,2
A	<p>FREY W ET AL: "Two-dimensional protein crystallization via metal-ion coordination by naturally occurring surface histidines" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 93, May 1996 (1996-05), pages 4937-4941, XP002096863 abstract figures 1,2</p> <p>---</p>	12,14
A	<p>DIETRICH C, SCHMITT L, TAMPÉ R: "Molecular organization of histidine-tagged biomolecules at self assembled lipid interfaces using a novel class of chelator lipids" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 92, September 1995 (1995-09), pages 9014-9018, XP002096864 abstract pages 9014-15 alinéa "materials and methods" "lipids" figure 6</p> <p>---</p>	12,14
A	<p>KUBALEK EW LE GRICE SFJ, BROWN PO: "Two-dimensional crystallization of histidine-tagged, HIV-1 reverse transcriptase promoted by a novel nickel chelating lipid" JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY, vol. 113, no. 2, 1994, pages 117-123, XP002096865 cited in the application abstract figure 1</p> <p>-----</p>	12,14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01086

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
---	---------------------	----------------------------	---------------------

WO 9732571	A	12-09-1997	
		AU 2197997 A	22-09-1997
		CA 2247820 A	12-09-1997
		CN 1217653 A	26-05-1999
		EP 0910340 A	28-04-1999

---

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dernière Internationale No  
PCT/FR 99/01086

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 G01N33/543 G01N33/547 C12N11/06 C07C235/20 C07D495/04  
C07C233/40 C07F1/00 C07F15/04

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 G01N C07C C07D C07F C30B C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 97 32571 A (HYPERION CATALYSIS INT ; FISCHER ALAN (US); HOCH ROBERT (US); MOY D) 12 septembre 1997 (1997-09-12) cité dans la demande page 1, ligne 8-19 page 9, ligne 13-18 page 25, ligne 27 - page 26, ligne 14 page 29 - page 31; exemples 11,12 revendication 31  --- -/-	1,2

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 août 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/08/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

La Gaetana, R

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

BNSDOCCID: <WO\_\_\_\_\_9957564A: 1\_>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No  
PCT/FR 99/01086

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>TSANG SC ET AL: "Immobilization of small proteins in carbon nanotubes: high-resolution transmission electron microscopy study and catalytic activity" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS, vol. 17, 1995, pages 1803-1804, XP002096861 cité dans la demande le document en entier</p>	1,2
A	<p>DAVIS JJ ET AL: "The immobilization of proteins in carbon nanotubes" INORGANICA CHIMICA ACTA, vol. 272, no. 1,2, 1998, pages 261-266, XP002096862 cité dans la demande abrégé page 262, alinéa 2.1 - alinéa 2.2.2</p>	1,2
A	<p>FREY W ET AL: "Two-dimensional protein crystallization via metal-ion coordination by naturally occurring surface histidines" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 93, mai 1996 (1996-05), pages 4937-4941, XP002096863 abrégé figures 1,2</p>	12,14
A	<p>DIETRICH C, SCHMITT L, TAMPÉ R: "Molecular organization of histidine-tagged biomolecules at self assembled lipid interfaces using a novel class of chelator lipids" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 92, septembre 1995 (1995-09), pages 9014-9018, XP002096864 abrégé pages 9014-15 alinéa "materials and methods" "lipids" figure 6</p>	12,14
A	<p>KUBALEK EW LE GRICE SFJ, BROWN PO: "Two-dimensional crystallization of histidine-tagged, HIV-1 reverse transcriptase promoted by a novel nickel chelating lipid" JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY, vol. 113, no. 2, 1994, pages 117-123, XP002096865 cité dans la demande abrégé figure 1</p>	12,14

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De de Internationale No

PCT/FR 99/01086

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9732571 A	12-09-1997	AU 2197997 A	22-09-1997
		CA 2247820 A	12-09-1997
		CN 1217653 A	26-05-1999
		EP 0910340 A	28-04-1999



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**